

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：34506

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24687002

研究課題名(和文)線虫の神経回路における相反性シナプス伝達の分子メカニズム

研究課題名(英文)Molecular mechanism for opposite synaptic transmission in neural circuit of *C. elegans*

研究代表者

久原 篤 (Kuhara, Atsushi)

甲南大学・理工学部・准教授

研究者番号：00402412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：線虫 *C. elegans* において、温度応答に関わるシンプルな神経系をつかい、温度情報伝達に関わるシナプス情報伝達やシナプス区画化に関わる分子をスクリーニングし、個体レベルでの温度応答の表現型に関して正と負の相反性の制御に関わる分子生理機構を解明することをめざした。解析方法としては、分子遺伝学や個体温度応答に加え、神経活動の光学イメージング技術ももちいた。得られた結果としては、温度受容ニューロンにおける神経伝達物質の自己制御と、温度応答に関わる介在神経におけるプレシナプスとポストシナプスの区分けの分子機構、新規の温度応答現象の解析系の確立があげられる。

研究成果の概要(英文)：To identify molecular and physiological mechanisms for complicated-synaptic transmission system and compartment of synapse localization, we used simple neural circuit underlying temperature sensation and response. We utilized molecular genetics and optical imaging of various mutants of nematode *C. elegans*. We found that molecular mechanism for self-activation of glutamate signaling, compartmentalization between pre- and post synapses in single neural process, and novel paradigm for analysis of temperature response.

研究分野：分子神経遺伝学

キーワード：線虫 *C. elegans* 温度応答 神経回路 カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

高次神経機能を獲得した動物は、常に変化する環境において出来事を予測し、行動することによって生存や繁殖の確率を高める。この能力は脊椎動物だけでなく、線虫やハエといった無脊椎動物にも存在する。古くから神経細胞間の情報伝達にはシナプスが関与しており、そのシナプス伝達には興奮性と抑制性の2種類があることが知られていた。これまでに、単一のニューロンは、それと接続する単一のニューロンに対して、興奮性が抑制性のどちらかの神経伝達しか行なわないと主に考えられている。そのなかで、本申請者らの線虫における解析から、温度受容ニューロンが、それと接続する単一の介在ニューロンに対して(Kuhara et al., *Science*, 2008)、興奮性と抑制性の相反する神経伝達を同時に行っていることが見つかった(Kuhara et al., *Nature commun*, 2011; Ohnishi, Kuhara, *EMBO J.*, 2011)。しかし、新しく見つかった神経機能であるため、その分子制御機構や生理的な制御機構は十分には明らかになっていないため、解析を行った。

線虫の介在ニューロンは、1本の神経プロセス上にプレシナプスとポストシナプスという相反する機能を持つシナプスが混在している。そのため、プロセス内での神経情報処理の生理的機構の解明は興味深い。温度応答に関わる神経経路中の1つの介在ニューロンにおいて、プレシナプスとポストシナプスの局在が区分けされているケースが見つかったため、それをモデルとして、機能の相反するシナプス局在化のトポロジー制御機構の解析に着想した。また、個体の温度応答に関しても、正と負の相反する情報処理が重要であるが、その分子機構も十分には明らかになっていない。このような背景をふまえ、温度応答に関わる神経回路をモデル系として解析することにより、新たな神経情報処理の制御機構が明らかになると考え、本研究の着想に至った。

温度に対する応答に関する新しい現象から、温度情報処理に関する正と負の相反する情報処理の解析を行った。

2. 研究の目的

動物は、外界からの様々な情報を、神経回路で処理することで、個体の適切な応答を引き起こす。神経回路における情報処理を理解する為には、個々のシナプス伝達がコードしている情報を捉え、それぞれの情報が神経活動および行動をどのように制御しているかを明らかにすることが必要不可欠である。このシナプス伝達における情報の変化を捉えるため、本研究では、シンプルな神経回路により制御される線虫 *C. elegans* の温度応答をモデル系とした。これまでの研究により、温度走性行動を制御する神経回路において(図1)、(1) グルタミン酸をシナプス小胞内へ輸送する輸送体 VGLUT の線虫ホモログであ

る EAT-4 は AFD、AWC、RIA で機能していること、(2) AFD から放出される EAT-4 依存的グルタミン酸シグナルは、AIY の活動を抑制し、低温への移動を引き起こすこと、(3) AWC から放出される EAT-4 依存的グルタミン酸シグナルは、AIY の活動を促進させ、高温への移動を引き起こすこと、(4) 抑制性グルタミン酸受容体 GLC-3 は AIY で機能し、AIY の活動を抑制すること、(5) 代謝型グルタミン酸受容体の3重変異体が温度走性異常を示すことが明らかになっている。そこで本研究は、グルタミン酸作動性シナプス伝達の神経回路レベルでの制御機構を解明する目的で、線虫の温度走性行動における、グルタミン酸作動性シナプス伝達に関与する分子 EAT-4 および各種グルタミン酸受容体の機能解析を試みた。

神経細胞の多くは、樹状突起でシナプス入力を受け、軸索からシナプス出力をするという極性を持っている。線虫の RIA ニューロンは、1本の神経突起内でシナプスの入力部位(ポストシナプス)と出力部位(プレシナプス)が分かれている。これまでに、イノシトール産生酵素 myo-inositol monophosphatase (IMPase) の線虫ホモログ TTX-7 を欠失する変異体では、RIA のシナプス極性が異常になる事が示されていた。さらに、この RIA のシナプス異常は、温度に対する走性行動に異常を引き起こす事が示された。しかし、IMPase/TTX-7 がいかにしてシナプスの極性を制御しているかは明らかにされていなかったため、その分子機構を解析した。

これまでに線虫において温度に関わる応答現象として、温度走性や耐性幼虫形成が知られていたが、それ以外の未知の現象が温度応答の解析モデルになり得るかを解析した。

3. 研究の方法

AFD の機能を欠失した変異体 (*gcy-23 gcy-8 gcy-18*) と AWC の機能を欠失した変異体 (*odr-3*)、AWC の機能を過剰促進した変異体 (*eat-16*)、RIA の機能を欠失した変異体 (*ttx-7*) を用いて、集団温度走性テストを指標とした遺伝学的解析を行った。また、MGL-3 の cell specific rescue 実験や GLC-3 との遺伝学的解析を行った。

順遺伝学的解析と既存の多数の変異体をもちいた RIA 介在ニューロンのシナプス局在パターンの解析を共焦点顕微鏡をもちいて行った。

温度が関わる様々な応答現象の定量化を行った。

4. 研究成果

glc-3 変異体の示す温度走性異常は AFD の機能を欠失した変異体の示す温度走性異常により完全に抑圧されたが、AWC の機能を欠失した変異体や AWC の機能を過剰促進した変異体ではそれぞれの中間の表現型を示した。

この結果は、GLC-3 が AFD からのグルタミン酸を受容することを示唆する。AFD のみで機能回復させた *eat-4(AFD+)* 変異体の示す温度走性異常は RIA の機能を欠失した変異体の示す温度走性異常により完全に抑圧された。このことは、RIA はグルタミン酸以外の神経伝達物質も放出し、ポストシナプスへシグナルを伝達していることを示唆する。代謝型グルタミン酸受容体の 3 重変異体の温度応答異常の回復実験を 1 種類の cDNA を用いて行なったところ、温度受容ニューロンで cDNA を発現させた場合に温度応答異常が完全に回復した。さらに、3 つの代謝型グルタミン酸受容体のうち 2 つと *glc-3* 変異を組み合わせた 3 重変異体は、その組み合わせによって *glc-3* 変異体と同様の表現型を示したり、中間の表現型を示したりした。これらのことは、MGL-3 が伝達する情報には、少なくとも GLC-3 を介さない経路が存在していることを示唆する。

今回解析したグルタミン酸受容体遺伝子はグループ に属する代謝型グルタミン酸受容体をコードしていると考えられており、プレシナプスで機能する可能性が考えられている(Dillon et al., 2006)。このことと、以上の結果を合わせると、この代謝型グルタミン酸受容体は温度受容ニューロンから放出されるグルタミン酸シグナルを受容する autoreceptor として機能していることが期待される。さらに、代謝型グルタミン酸受容体が伝達する情報には、GLC-3 を介さない経路を通ることが示唆された。このことから、伝達する情報にはグルタミン酸以外の神経伝達物質の放出に関与している、または温度受容ニューロンから放出されるグルタミン酸シグナルが GLC-3 以外の受容体にも作用して、温度応答行動に影響を与えている可能性が考えられる。近年、少数のニューロンによって構成される単純な神経回路内の情報処理を捉えることの重要性が提唱されており、本研究は神経回路における情報処理機構の基盤的研究になると考えられる。

相反する機能を持つシナプスの局在区分けについては、synaptojanin の線虫ホモログ UNC-26 などの機能欠失変異が、イノシトール脱リン酸化酵素欠失変異体のシナプス区分けの異常を抑圧することを見いだした。UNC-26 は phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) を代謝する酵素であることから、これらの酵素活性が失われ、PIP₂ が蓄積することが、異常を抑圧することにつながったと考えられる。これらのことから、IMPase は PIP₂ 量をコントロールすることで、シナプスの局在区分けを維持していると考えられる。

温度が関わる新しい現象の解析に関しては、新たに低温適応現象を見つけた。線虫の低温適応現象とは、例えば、20 で飼育された線虫を 2 に 48 時間静置すると、その後 2 から 20 に戻しても大部分が死滅してしまうのに対して、15 で飼育された個体は、

2 に置かれても生存できるという現象である。この現象に関わる感覚ニューロンを同定し、そのニューロンのシナプスからインスリンがおそらく神経伝達物質として分泌され、低温適応を負に制御することを見いだした。また DNA マイクロアレイ解析から、温度変化に応じて発現変動する遺伝子を調べたところ、神経ペプチドが低温適応を正に制御する可能性が見いだされた。これらのことから温度応答を正と負に制御する神経機構の新しい解析モデルが確立できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

(1) Ohta A., Ujisawa T., Sonoda S., Kuhara A.
Light and pheromone-sensing neuron regulates cold habituation through insulin signaling in *C. elegans*
Nature commun, 5, 4412, 1-12, 2014 (査読有)

(2) Ujisawa T., Ohta A., Okahata M., Sonoda S., Kuhara A.
Cold tolerance assay for studying cultivation-temperature-dependent cold habituation in *C. elegans*
Protocol *Exchange*,
doi:10.1038/protex.2014.032, 2014 (査読無)

(3) Ohta, A. & Kuhara, A.
Molecular mechanism for trimetric G protein-coupled thermosensation and synaptic regulation in the temperature response circuit of *Caenorhabditis elegans*
Neuroscience Research, Vol. 76, 3, 119-124, 2013 (査読有)

Kimura, T., Kita, H., Hira, S., Kuhara, A., Kusakabe, T. G., Michinome, M., Kobayashi, S., Mukai, M.
Transcriptional regulatory regions that promote innexin2 expression in somatic support cells in the *Drosophila* ovary.
Mem. Konan Univ., Sci. Eng. Series, 60, 1, 1-9, 2013 (査読有)

(4) Kimata T., Tanizawa Y., Can Y., Ikeda S., Kuhara A., Mori I.
Phosphatidylinositol signaling regulated by myo-inositol monophosphatase is essential for synaptic polarity in *Caenorhabditis elegans*
Genetics, 191, 2, 509-521, 2012

doi: 10.1534/genetics.111.137844(査読有)

(5) Nishio, N., Mohri-Shiomi, A., Nishida, Y., Hiramatsu, N., Kodama, E., Kimura, K., Kuhara A., Mori, I.

A Novel and Conserved Protein AH0-3 Is Required for Thermotactic Plasticity Associated with Feeding States in *Caenorhabditis elegans*

Genes to Cells, 17(5), 365-386, 2012

doi: 10.1111/j.1365-2443.2012.01594.x.

(査読有)

(6) Ohnishi N. & Kuhara A.

Neural processing mechanism underlying temperature response of nematode *Caenorhabditis elegans*

Comp. Physiol. Biochem., 2012, Vol. 29 No.

3, p112-120, 2012 (査読有)

(7) 久原 篤

線虫の温度応答の分子生理メカニズム

生物物理, 52, 4, 200-202, 2012 (査読有)

[学会発表 (招待講演のみ記載)] (計 7 件)

(1) Kuhara A.

Light and pheromone sensoryneuron regulates temperature habituation in *C. elegans*

12th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception

(招待講演 国際シンポジウム)

2014年11月02日~2014 年11月03日

Kyusyu Univ

(2) 久原篤

線虫 *C. エレガンス* を用いた温度感知と記憶の神経機能解析

実験動物技術者協会シンポジウム

(招待講演 国内シンポジウム)

2014年11月29日~2014 年11月30日

広島

(3) 久原 篤

線虫の磁気と温度に対する応答と行動

関西サイエンスフォーラム専門家シンポジウム

(招待講演 国内シンポジウム)

2014 年 03 月 17 日

大阪大学

(4) 久原 篤

動物の感覚と記憶の暗号をひも解く

統合ニューロバイオロジー研究所 シンポジウム

(招待講演 国内シンポジウム)

2014 年 01 月 15 日

神戸

(5) Kuhara A.

Controlling and measuring temperature responses by optogenetics

International Optogenetics symposium

(招待講演 国際シンポジウム)

2013年09月26日~2013年09月27日

Keio Univ

(6) 久原 篤

線虫の温度応答の神経システム

Neural system for temperature response in *C. elegans*

光の、光による、光のためのタンパク質科学

(招待講演 国内研究セミナー)

2013年04月20日~2013 年04月21日

大阪大学

(7) 久原 篤

動物の温度応答の分子遺伝学

遺伝学会

(招待講演 プレナリーワークショップ)

2012年09月25日~2012 年09月25日

九州大学

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

久原研究室ホームページ

<http://kuharan.com/index.html>

甲南大学研究者紹介

http://researchers.adm.konan-u.ac.jp/html/100000141_ja.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

久原 篤 (K U H A R A A T S U S H I)

甲南大学・理工学部・准教授

研究者番号 : 0 0 4 0 2 4 1 2